

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

20 December 1999 (20.12.99)

International application No.

PCT/JP99/02698

Applicant's or agent's file reference

YCT-424

International filing date (day/month/year)

24 May 1999 (24.05.99)

Priority date (day/month/year)

22 May 1998 (22.05.98)

Applicant

OKANO, Teruo et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 November 1999 (30.11.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-424	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/02698	国際出願日 (日.月.年) 24.05.99	優先日 (日.月.年) 22.05.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ G01N30/48		
出願人 (氏名又は名称) 岡野 光夫		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.11.99	国際予備審査報告を作成した日 02.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀 田 宏 之	2 J 9 0 1 5
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	有
	請求の範囲 1-14	無
進歩性(IS)	請求の範囲	有
	請求の範囲 1-14	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	有
	請求の範囲 1-14	無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 8-103653, A (テルモ株式会社) 23. 4月. 1996
(23. 04. 96)

文献2: JP, 9-49830, A (テルモ株式会社) 18. 2月. 1997
(18. 02. 97)

請求の範囲1-14に記載された発明は、文献1, 2から新規性を有さない。
文献1, 2には、N-イソプロピルアクリルアミド等のポリマーからなる、熱、
pH、電位、光などによって高次構造変化や、イオン解離等をおこす刺激反応性高分子
からなる刺激応答分離材料を用いて、試料を分離することが記載されている。

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 G01N 30/48, 30/54	A1	(11) 国際公開番号 WO99/61904 (43) 国際公開日 1999年12月2日(02.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02698 (22) 国際出願日 1999年5月24日(24.05.99) (30) 優先権データ 特願平10/140722 1998年5月22日(22.05.98) JP (71) 出願人；および (72) 発明者 岡野光夫(OKANO, Teruo)[JP/JP] 〒272-0827 千葉県市川市国府台6-12-12 Chiba, (JP) (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社 (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH K.K.)(JP/JP) 〒169-0073 東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サンケンビルヂング Tokyo, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 菊池明彦(KIKUCHI, Akihiko)[JP/JP] 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-26-1-401 Tokyo, (JP) 桜井靖久(SAKURAI, Yasuhisa)[JP/JP] 〒168-0064 東京都杉並区永福3-17-6 Tokyo, (JP)	金澤秀子(KANAZAWA, Hideko)[JP/JP] 〒228-0802 神奈川県相模原市上鶴間2896-1-303 Kanagawa, (JP) 松島美一(MATSUSHIMA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒210-0022 神奈川県川崎市川崎区池田2-3-21 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
<p>(54)Title: PACKING MATERIAL FOR CHROMATOGRAPHY HAVING NOVEL CHARACTERISTIC AND METHOD FOR ISOLATION OF SUBSTANCE USING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤およびそれを用いた物質の分離方法</p> <p>(57) Abstract A separation by chromatography using a packing material comprising an electrically charged copolymer is carried out in which a mobile phase is an aqueous phase and the effective charge density on the surface of a stationary phase can be changed by a physical stimulus. This method allows an efficient separation of biological components and the like, which may not be separated by ion exchange chromatography alone or reversed phase chromatography alone, without adversely affecting their activities.</p>		

(57)要約

移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行う。この方法によれば、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離できない生体成分等とその活性を損なうことなく効率的に分離することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

新規な特性を有するクロマトグラフィー用充填剤

およびそれを用いた物質の分離方法

5 技術分野

本発明は、水系で固定相表面の有効荷電密度あるいは親水性／疎水性のバランスを外的信号（例えば、温度）によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤およびそれをを用いて金属元素、医薬品、および生体成分などの物質をクロマトグラフィーにより分離する物質の新規な分離方法に関する。

背景技術

液体クロマトグラフィーは固定相と移動相との組み合わせや分離にあずかる相互作用の様式により多種多様である。液体クロマトグラフィーは金属元素の分離、
15 医薬品の分離精製、生化学分野のペプチドや蛋白質、核酸などの分離に重要である。さらには最近進歩の著しい遺伝子工学手法により生産される組換え蛋白質などのバイオ医薬への応用が盛んになるにつれ、これらの分離精製のための効率的な分離法の要求がさらに強まりつつある。現在広く用いられているクロマトグラフィーとして、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等がある。
20

イオン交換クロマトグラフィーは不溶性保持担体表面の電解質を固定相として移動相中に存在する対イオンを可逆的に吸着することにより分離を行う。保持担体にはシリカ、セルロースやデキストラン、スチレンとジビニルベンゼンとの共重合体などが多く用いられている。これら担体にスルホン酸基、四級アンモニウム基などのイオン交換基を導入したものをイオン交換体として市販されている。
25 溶液中の水素イオン濃度に応じて溶質はカチオン、アニオン、両性イオンに解離し、この溶液をイオン交換カラムに流した時担体表面の逆電荷の交換基に溶媒イオンと競合して結合し、溶液とイオン交換体表面の間に一定の割合で分配する。この結合の強さによりカラム内を移動する速度が異なることを利用して分離する。

この分配はいくつかの方法により変化させることができる。例えば、移動相中の競合するイオン種の濃度により、変化させることができる。また、溶液の水素イオン濃度を变化させ、担体表面のイオン交換基のイオン化の割合を変化させる。したがって、イオン交換クロマトグラフィーでは移動相のイオン強度や水素イオン濃度を調節して溶質の順序を変化させ分離することが一般的に行われている。

また、逆相クロマトグラフィーでは疎水性の固定相と極性の移動相から成り立っている。溶質はその疎水性度に応じて移動相と固定相との間で分配され分離される。これらの場合にも移動相の溶媒の疎水性度を変化させ移動相と固定相との間の分配を変化させ溶出している。また、移動相の溶媒には有機溶媒を用いるために分離対象になる生体成分の活性を損なう恐れがある。

いずれにしてもイオン交換クロマトグラフィーでも、逆相クロマトグラフィーでも基本的には移動相の溶媒を様々に変化させて溶出分離を行っている。溶出に用いている溶媒の酸や有機溶媒により、目的のサンプルの活性を損なう可能性がある。

また、一つの担体で一つのクロマトグラフィーのモードを採用しているために、それぞれのクロマトグラフィーで分離を行う場合にはそれぞれ別々の操作でクロマトグラフィーを別々に行う必要がある。これらの問題を解決するために 1 種類の担体でしかも 1 種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体を開発することにより、短時間で効率よい分離が可能となり、従来分離し得ないものも分離可能になる。

また、生体成分には電荷を持たないものや持つものなど多種多様である。一般に、イオン化する化合物は、イオン化していない状態では疎水性充填剤に対して疎水性相互作用によって保持される。しかしイオン化されると疎水性充填剤に対して疎水性相互作用は弱まる。イオン解離性化合物の解離定数に差がある場合の分離は、イオン交換体を用いることによりイオン-イオン相互作用によって容易に行うことができる。

一般に、塩基性のタンパク質の分離には弱酸性のイオン交換樹脂が、酸性のタンパク質の分離には弱塩基性のイオン交換樹脂が適していることが知られている。このようにイオン交換性の置換基を導入することにより、イオン-イオン相互作用

用による分離により、疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質への応用が広がることが期待できる。

- 5 しかしながら、1種類の担体でしかも1種類の物理刺激でイオン交換クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを行い得る担体や疎水性が同程度で分子量に差がなく疎水性相互作用のみでは分離が困難な化合物およびタンパク質や核酸オリゴマーなどの生体分子などの多くの物質を効率的に分離することが可能な担体はこれまで存在しなかった。

10 発明の開示

- そこで、本発明者らは上記の課題を解決すべく種々の観点から検討および開発を行った。その結果、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAm）に正電荷を持つジメチルアミノプロピルアクリルアミド（DMAPAAm）を共重合させることでイオン交換機能をもった新しい充填剤を作製し、これを用いて
- 15 温度によるコントロールを行えば逆相クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーの双方を行い得ることを見いだした。また、共重合体に電荷を持つものを用いたことでポリマーのLCSTをpHによってもコントロールできることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

- 本発明は、移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を外的
- 20 刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法に関する。

- また、本発明は、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラ
- 25 ディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法に関する。

 さらに、本発明は、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させる

ことが可能である、荷電を有する共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤に関する。

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、固定相の表面構造を温度などの外的な物理刺激で変化させることにより、担体表面に存在するイオン交換基の荷電状態を可逆的に制御しうる。すなわち、本発明は、単一の水系溶媒である移動相（水系移動相）によって、2つのモード、即ちイオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを同時に行い得る固定相を提供するものであり、しかもイオン交換クロマトグラフィーのモードにおいては担体表面のイオン交換基の荷電を、逆相クロマトグラフィーでは親水性／疎水性のバランスを自由に制御が可能な担体を提供するものである。なお、ここでいう水系溶媒とは水のみ、あるいは無機塩類を含む水溶液であって、有機溶媒を含まないものを意味する。

本発明は移動相を水系に固定したまま、固定相の表面のイオン交換基周辺の物性や構造を物理刺激により、制御して表面のイオン交換基の電荷を調節することによって分離を行うことを特徴とする分離精製担体を提供するものである。即ち、本発明によれば、外部温度を臨界温度以下ではイオン交換基が担体表面に表出し、分離する生体成分はイオン交換基との相互作用し、イオン交換クロマトグラフィーのモードで分離する。外部温度が臨界温度以上では表面に荷電が弱まり、疎水性が増大し、逆相クロマトグラフィーのモードで分離が可能になる。外部温度により担体表面の親水性／疎水性バランスを可逆的に自由に変化することが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、実施例2に記載された2種類の充填剤を用いてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

図2は、実施例3においてpHを変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

図3は、実施例4においてイオン強度を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフで

ある。

図4は、実施例5においてIPAAmとDMAPAAmの重合比率を変えてアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した場合の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

5

発明を実施するための最良の形態

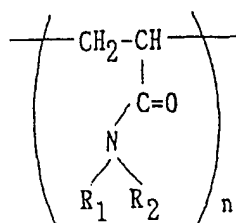
本発明の方法における外的な物理信号とは、例えば温度変化である。温度変化により、充填剤表面のイオン交換基周辺の物性や構造を変化させることは、例えば担体表面に温度応答性ポリマーを導入することで達成される。このような充填
10 剤は、例えば、担体表面を、側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシ基、あるいは水酸基等を有するアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤が挙げられる。化学修飾した充填剤には、例えばシリカ担体に前記のアルキルアクリルアミド重合体あるいはその共重合体で修飾したものを挙げる事が出来る。また、イオン交換基の導入には前記
15 のアルキルアクリルアミドとアミノ基やカルボキシ基を有するモノマーとの共重合体で化学修飾することで得られる。

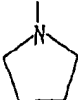
アミノ基を有するポリマーの構成単位としてジアルキルアミノアルキル(メタ)アクリルアミド、ジアルキルアミノアルキル(メタ)アクリレート、アミノアルキル(メタ)アクリレート、アミノスチレン、アミノアルキルスチレン、アミノ
20 アルキル(メタ)アクリルアミド、アルキルオキシアルキルトリメチルアンモニウム塩、(メタ)アクリルアミドアルキルトリメチルアンモニウム塩等が挙げられる。また、カルボキシ基を有するポリマーの構成単位としてアクリル酸、メタクリル酸、スルホン酸を有するポリマーの構成単位として(メタ)アクリルアミドアルキルスルホン酸等が挙げられる。

25 本発明の方法において使用するポリアルキルアクリルアミドとしては、下記に示すポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミド、ポリ(N-プロピルアクリルアミド)およびポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種、或いはこれらのポリマーの構成単位とアルキルアクリレートもしくはアルキルメタクリレートとの共重合体が望ましい。

化学式 1

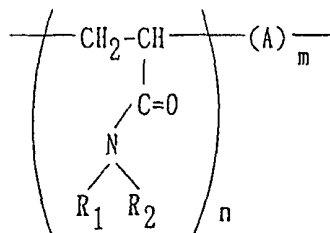
ポリ-アルキルアクリルアミド



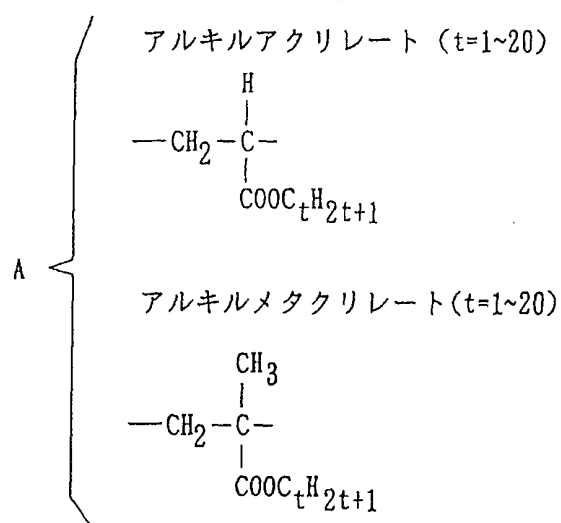
	R ₁	R ₂	略号
ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)	-H	$-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ポリ(IPAAm)
ポリ(N,N'-ジエチルアクリルアミド)	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	ポリ(DEAAm)
ポリ(アクリロイルピロリジン)			ポリ(APy)
ポリ(N-プロピルアクリルアミド)	-H	-C ₃ H ₇	ポリ(PAAm)

化学式 2

共重合体



A : 50 ~ 60 % 含有



- ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) は 32℃ に下限臨界温度を有するので、該分子で化学修飾した担体はこの臨界温度で親水性 / 疎水性の表面物性を大きく変化させるため、これをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして使用した場合、試料に対する保持力が温度によって変化させられる結果溶出液の組成を変化させずに保持挙動を温度によってコントロールすることが可能である。下限臨界温度を 32℃ 以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、ビニルピロリドンなどの親水性のコモノマーを N-イソプロピルアクリルアミドと共重合させることによって調整することが可能である。また、下限臨界温度を 32℃ 以下にしたいときは、疎水性モノ

マーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどとの疎水性のコモノマーとの共重合によって調整することができる。

また、ポリジエチルアクリルアミドの下限臨界温度は、約30℃～32℃であり、この温度を境として親水性／疎水性に表面物性が変化し、前述のポリ（N-
5 イソプロピルアクリルアミド）の場合と同様に、試料に対する保持力を温度によって調整することができる。本発明で利用される新規なクロマトグラフィー用担体は、化学修飾或いは高分子のコーティングによって作製される。化学修飾手段としては表面グラフト法とラジカル重合の2つの方法を用いることができる。またコーティング方法としては、適用温度範囲内で不溶とした後、不溶なものをコー
10 ティングする。

上記したように、温度応答性高分子を担体へ導入するための化学修飾法は表面グラフト法とラジカル重合法を用いることができる。表面グラフト法は一定の大きさの温度応答性高分子を始めに合成して、担体に接合する方法であるのに対し
15 法である。表面グラフト法に比較し、担体表面に密に温度応答性高分子を導入することが可能である。担体表面の疎水性度を増大させ、保持時間をコントロールしやすくなる。また、担体表面でのシリカゲルとの相互作用による非特異的吸着を抑えることができる。

本発明の分離方法によって分離することができる物質としては、金属元素（例
20 えば、Cu²⁺、Mn²⁺等）、医薬品（例えば、ステロイド化合物、解熱鎮痛剤等）、生体成分（例えば、ペプチド、タンパク質、核酸等）等が挙げられる。特に、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独では分離することができない種々の生体成分の分離に有効である。

25 実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

実施例 1

1. ポリマーの合成

1-1) ポリ (IPAAm-DMAPAAm) (DMAPAAm: N, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド)

1-1-a) カルボキシル末端基を持つ IPAAm 共重合体の作製

- 5 カルボキシル末端基を持つ IPAAm 共重合体を分子量 4000 を目安として合成した。ここで共重合体の分子量は、連鎖移動剤である 3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) の量によって設定することができる。分子量 4000 の共重合体を作製するには、モル比で $MPA / (IPAAm + DMAPAAm) = 0.028$ となるように MPA の量を調整した。

- 10 精製モノマー IPAAm: 25.0 g

カチオン性モノマー IPAAm に対しモル比で DMAPAAm 5%: 1.72 g

ラジカル開始剤 2, 2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (AIBN): 0.145 g

- 15 連鎖移動剤 (3-メルカプトプロピオン酸) 0.691 g

DMF (N, N-ジメチルホルムアミド) 50 ml

- 上表にある物質を重合管に入れ、三方活栓を取り付け輪ゴムで固定した。そして、コックを閉じた状態で重合管を液体窒素中に入れ完全に凍結させ、次にコックを開いて真空ポンプを用いて脱気した。次に再びコックを閉じて重合管をメタノール中に入れ管内のサンプルを完全に溶解させた。この操作を 3 回繰り返した (凍結融解脱気法)。このように、充分脱気したサンプルで減圧状態になっている重合管を 70℃ の振とう恒温槽に入れ、2 時間ラジカル重合反応させ片末端にカルボキシル基を持つ共重合体を合成した。反応後、室温になるまで放置し、溶媒 (DMF) を 40℃ で減圧蒸留し濃縮し、残留物を氷冷したジエチルエーテル
- 25 に滴下しポリマーを得た。得たポリマーを濾取し、常温で一晩減圧乾燥し、その乾燥物をアセトンに溶かし再びジエチルエーテルで精製した。これによって得たポリマーを再び濾取しこれを常温で一晩減圧乾燥した。ここで得たポリマーを 5% (w/v) の溶液になるように精製水にとかした。これを分画分子量 500 の透析膜に移し 3 日間透析を行った。これによって、分子量のそろった純度の高

い共重合体を得た。

1-1-b) IPAAm共重合体の担体への導入

(a) 活性エステル(スクシニル)化法

- 合成した共重合体をスクシニル化するにあたり、モル比で合成共重合体：N，
5 N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(N，N'-Dicyclohexyl carbodiimide (DCC))：N-ヒドロキシスクシンイミド(N-Hydroxysuccinimide) = 1：2.5：2の割合になるように調整した。

- ナス型コルベンに合成共重合体を入れ、半量の酢酸エチル(25～30 mL)
10 で溶かした後N-ヒドロキシスクシンイミドとDCCを加え残りの酢酸エチルを加え溶かした。次に4℃の氷水に浸し2時間スターラーで攪拌し、後に25℃に設定した恒温槽に入れて一晩攪拌した。溶液を濾過し、副生成物であるジシクロヘキシル尿素を取り除き、減圧下で濃縮した。最後にジエチルエーテルで精製し、生成物を濾取・減圧乾燥して得られたスクシニル化共重合体を冷凍庫に保存した。

- 15 1-1-c) 担体(シリカゲル)への導入

- スクシニル化した共重合体を、溶媒に1，4-ジオキサンを用いて、3回に分けてアミノプロピルシリカゲルと反応させた。反応温度は室温(25℃)で行った。まずスクシニル化ポリマー(1.0 g)を1，4-ジオキサン(50 mL)に溶かし、振とう恒温槽中でアミノプロピルシリカゲル(3 g)と一晩反応させた。
20 次に反応液を濾取したものと、新たな共重合体(1.0 g)を再び1，4-ジオキサン(50 mL)に溶かし一晩反応させた。この操作をもう一度繰り返したり最後に濾取したものを、メタノール(500 mL)、蒸留水(2 L)で十分洗浄し、これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。

25 実施例 2

1-2) PIPAAmハイドロゲル表面の作製

1-2-a) アミノプロピルシリカゲル表面へのゲル層の形成

はじめにアミノプロピルシリカゲルへ重合開始剤を導入するために下記の化合物を使用した。

アミノプロピルシリカゲル 5 g
 V-501 3.5 g (12.5 mmol)
 EEDQ 6.18 g (25.0 mmol)
 DMF 50 ml

- 5 上述の量でV-501 [4, 4'-アゾビス(4-シアノバレリン酸(4, 4'-azobis(4-cyanovaleric acid)) (分子量: 280.28)] を重合開始剤、EEDQ [N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline) (分子量: 247.30)]
- 10 を縮合剤として使用し、これらとアミノプロピルシリカゲルをDMF中で反応させた。これを遮光下で30分間N₂(窒素)ガスでバブリングしその後完全にN₂置換し、N₂風船をつけて室温で6時間反応させた。反応後ろ過してからDMFで洗浄した。これにより表面に重合開始剤を導入した。

1-2-b) 表面ゲル層の形成

- 15 1-2-aで作製したV-501結合シリカゲル 4 g
 IPAAm 10 g
 BIS 0.27 g
 EtOH 200 ml
 DMAPAAm IPAAmに対してモル比で8:2あるいは9:1になる量を添加した。
- 20

- シリカゲル、IPAAm、DMAPAA、BIS [N, N'-メチレンビス(アクリルアミド) (N, N'-Methylene-bis(acrylamide)) (分子量: 154.17)] をエタノールに溶解させた。これを遮光下で1時間N₂バブリングしその後完全にN₂置換し、N₂風船をつけて70℃(油浴)で5時間反応させた。これによりPIPAAm表面のゲル層を形成した。反応後ろ過したしてからメタノールと水で洗浄した。これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。これをステンレスカラムに充填して分析に用いた。
- 25

実施例 3

- 正電荷ゲル（IPAAm：DMAPAAm＝8：2）とIPAAmハイドロゲルを充填したカラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン（Aspirin）、サリチル酸（salicylic acid）、サリチル酸メチル（methyl salicylate）、安息香酸（benzoic acid）を分離した。

分離条件

- カラム：（１）ポリ（IPAAm）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム
（２）ポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（8：2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム
- 10 緩衝液： $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$
pH＝9.0
イオン強度＝0.1M

- 結果を図1に示す。IPAAmハイドロゲルを充填したカラムではアスピリンと安息香酸が分離出来ないが、正電荷ゲル（IPAAm：DMAPAAm＝8：2）を充填したカラムではこれらの化合物の分離が可能となった。特に10℃では荷電性物質および非荷電物質を含む4種すべての分離が20分程度の短時間で可能となった。分離順序はこれらの化合物の疎水性度に依存している。また温度上昇に伴い、保持時間（retention time）がサリチル酸と安息香酸では減少した。これは、温度上昇により温度応答性ポリマーの構造および物性が変
- 15 化し、担体表面の荷電が減少して表面と溶質との相互作用が減少したことによるものと考えられる。電荷をもたないサリチル酸メチルでは逆に保持時間が上昇している。これは温度上昇により温度応答性ポリマーが疎水性に変化したため
- 20 によると考えられる。

25 実施例4：pHの変化による影響

実施例3のポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（8：2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、緩衝液として $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ （クエン酸・ H_2O （一水和物））を用い、pH＝7.0とした以外は実施例3と同じ方法によりアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。結

果を図2に示す。

- 図2から、pH 9.0に比べてpH 7.0ではすべての物質において保持時間が増大したことがわかる。これはアニオン性化合物はpH 7.0でより正荷電を有する担体表面と強く相互作用するためと考えられる。したがって、pHにより
- 5 分離する物質の保持時間を調節することが可能であることが示された。

実施例5：イオン強度による影響

- 実施例3のポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（8：2）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラムを用いて、下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、
- 10 サリチル酸メチル、安息香酸を分離した。

分離条件

緩衝液： $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

pH = 7.0

イオン強度 = 1.0 M および 0.1 M

- 15 結果を図3に示す。イオン強度の増大（0.1 M → 1.0 M）により、電荷をもたないサリチル酸メチルを除くすべてにおいて、保持時間は減少し、サリチル酸メチルでは保持時間が増大した。イオン強度の増大により、担体表面のアミノ基のプロトン化が抑制され、正荷電が減少したために、アニオン性化合物との相互作用が弱くなったためと考えられる。サリチル酸メチルではイオン強度の増大
- 20 にとまって担体表面の疎水性が増大し、疎水性相互作用が強くなったためと考えられる。

実施例6：IPAAmとDMAPAAmの重合比率による影響

- 下記の分離条件でアスピリン、サリチル酸、サリチル酸メチル、安息香酸を分
- 25 離した。

分離条件

カラム：（1）ポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（9：1）ハイドロゲル修飾シリカ充填カラム

（2）ポリ（IPAAm-co-DMAPAAm）（8：2）ハイドロ

ゲル修飾シリカ充填カラム

緩衝液： $\text{NaHPO}_4/\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

pH = 7.0

イオン強度 = 0.1 M

- 5 結果を図4に示す。正荷電性のポリマーの増大により保持時間は増大した。この結果から、重合比率の変化により保持時間が調整可能であることがわかる。

産業上の利用の可能性

本発明は下記に示す利点を有する。

- 10 1) 担体表面に表出しているイオン交換体の荷電量を温度で自由に調節し、移動相の溶媒を変化させずに、単一の水系の移動相で分離が可能である。
- 2) 一回の操作で溶質の疎水性およびイオン性の違いにより、分離が可能である。2回の分離操作が1回で済み、効率的であり、回収率が向上する。
- 3) イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーそれぞれ単独で
- 15 は分離できない生体成分の分離が可能になる
- 4) 酸や有機溶媒を用いずに分離し、生体成分の活性を損なうことなく分離が可能になる。
- 5) 充填剤の再生が従来のイオン交換体に比べ速やかに行うことが出来る。

請 求 の 範 囲

1. 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含む
5 充填剤を用いてクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする物質の分離方法。
2. 物理刺激が温度変化である請求項 1 記載の分離方法。
3. 充填剤が、担体表面に温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 2 記載の分離方法。
- 10 4. 充填剤が、ラジカル重合法を用いて温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 記載の分離方法。
5. 温度応答性高分子が、担体表面を側鎖あるいは末端にアミノ基、カルボキシル基、あるいは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの重合体および共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項 3 または 4 記
15 載の分離方法。
6. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 5 記載の分離方法。
7. 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 1 ないし
20 6 のいずれか 1 項記載の分離方法。
8. アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に物質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過さ
25 せることによって物質を分離することを特徴とする物質の分離方法。
9. 移動相が水系溶媒である請求項 8 記載の分離方法。
10. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 8 または 9 のいずれ

か 1 項記載の分離方法。

1 1. 物質が金属元素、医薬品、および生体成分から選択される請求項 8 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の分離方法。

1 2. 固定相表面の有効荷電密度を物理刺激によって変化させることが可能である、荷電を有する重合体あるいは共重合体を含むクロマトグラフィー用充填剤。

1 3. 重合体あるいは共重合体がアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドの共重合体である請求項 1 2 記載のクロマトグラフィー用充填剤。

1 4. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリ（N-プロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項 1 2 または 1 3 記載のクロマトグラフィー用充填剤。

図 1

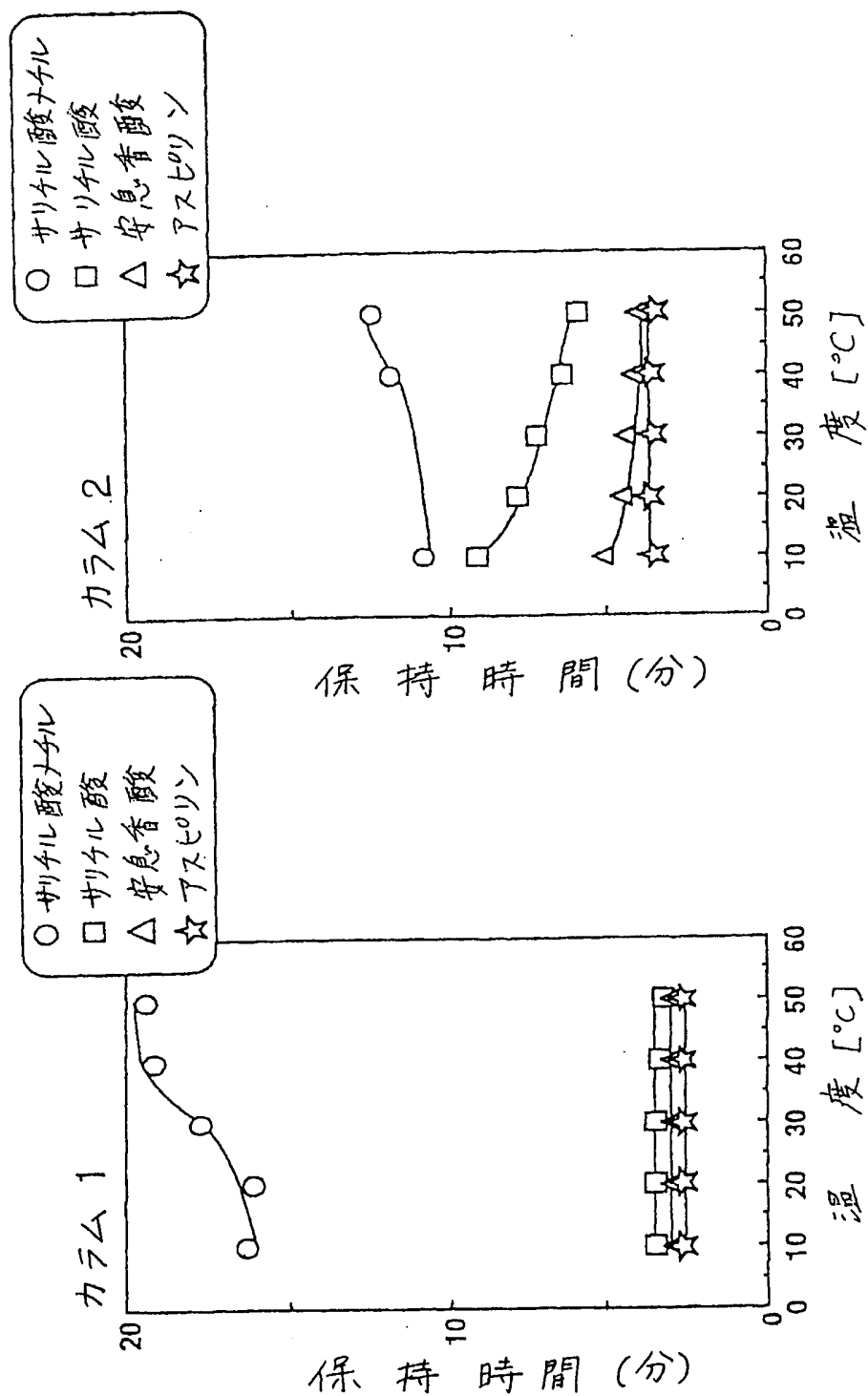


図 2

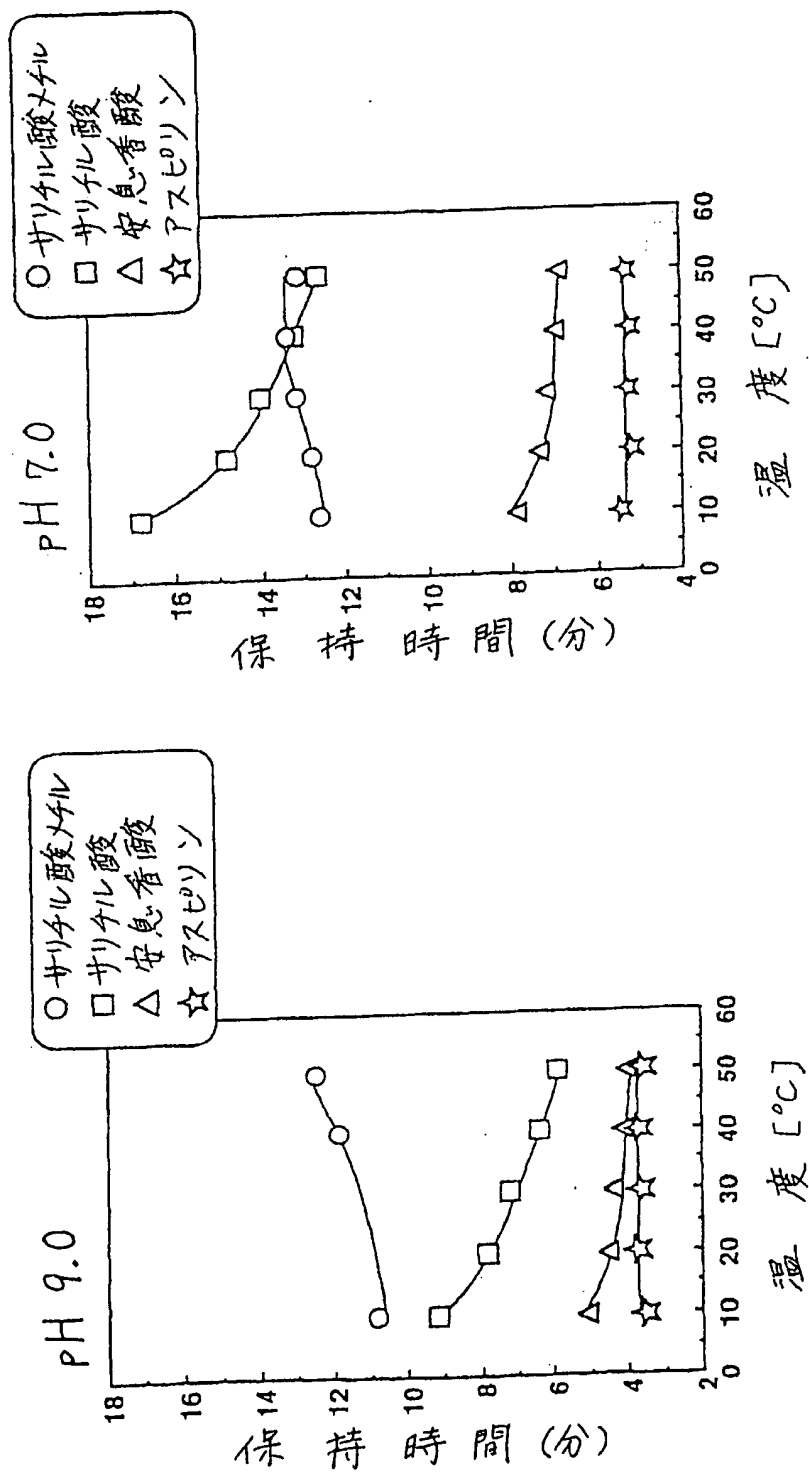


図 3

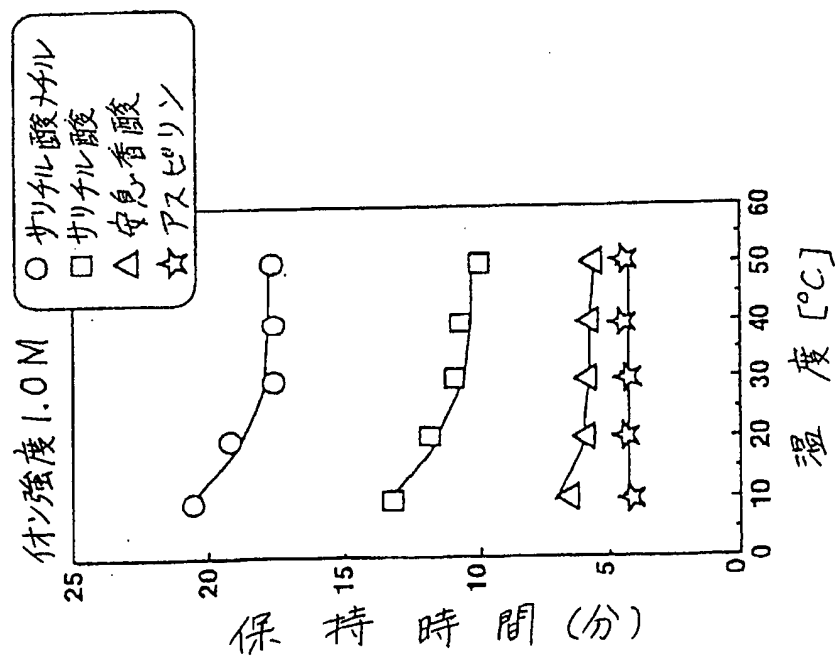
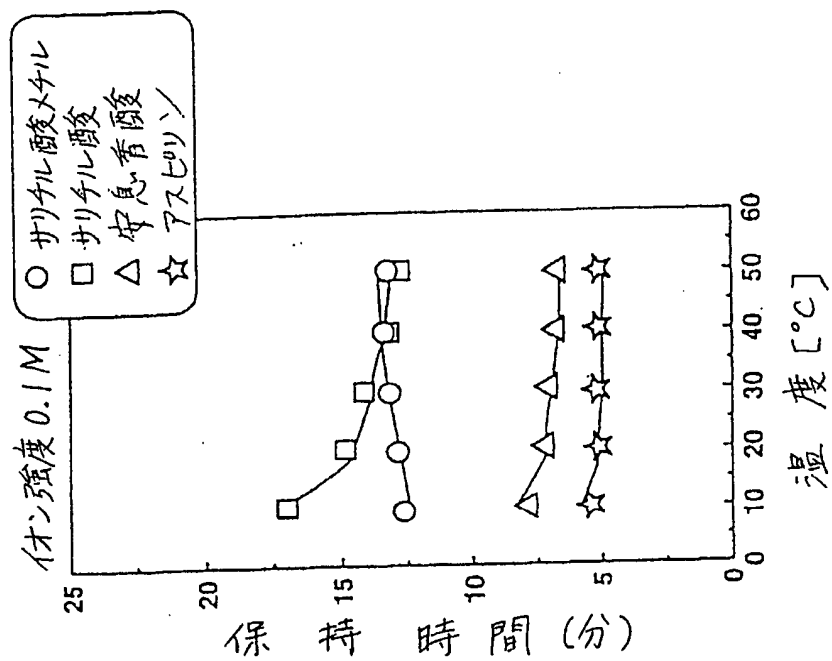
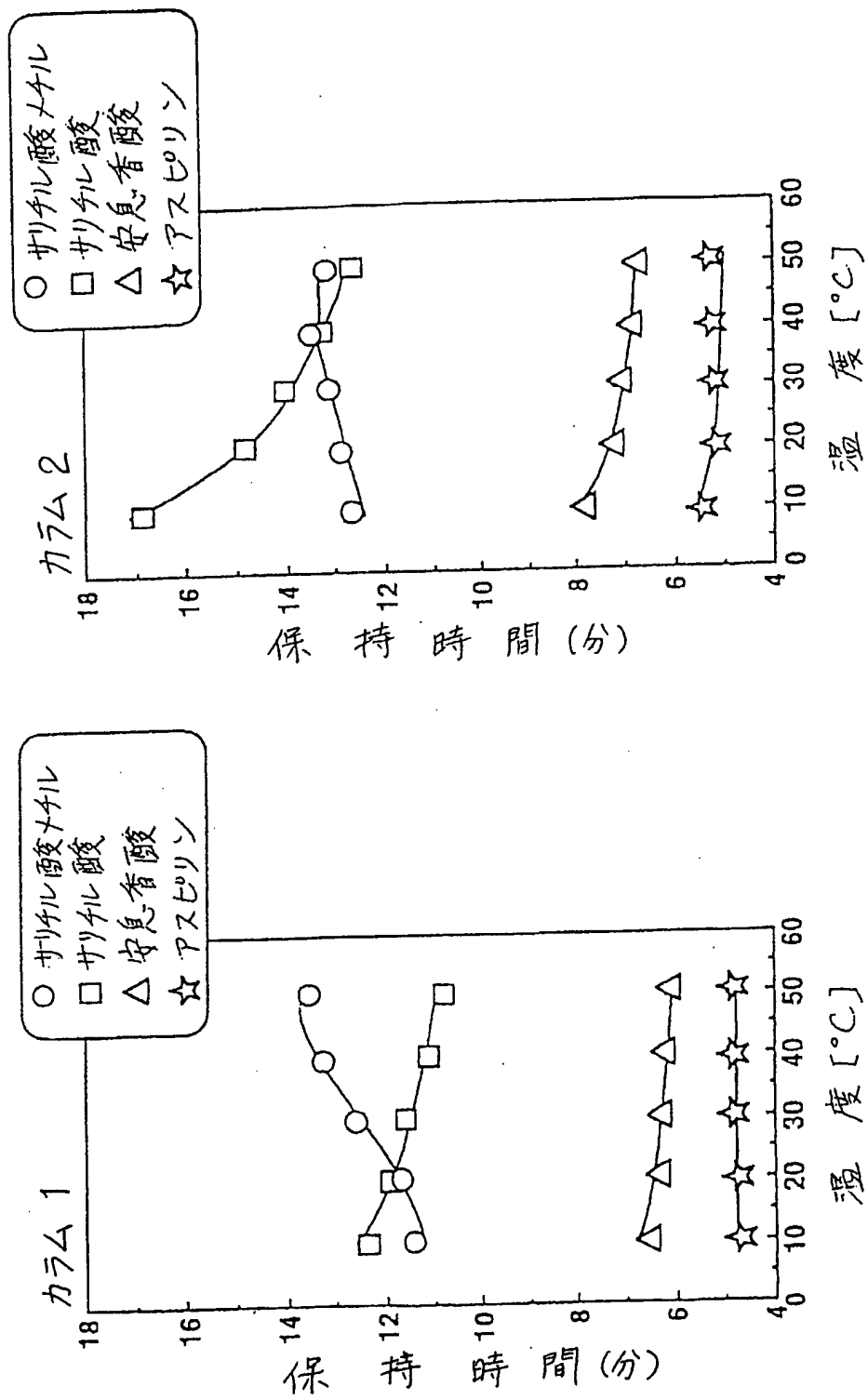


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N30/48, G01N30/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N30/48, G01N30/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1999 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-318551, A (Research Development Corp. of Japan), 8 December, 1995 (08. 12. 95) (Family: none)	1-14
X	JP, 8-103653, A (Terumo Corp.), 23 April, 1996 (23. 04. 96) (Family: none)	1-14
X	JP, 9-49830, A (Terumo Corp.), 18 February, 1997 (18. 02. 97) (Family: none)	1-14
X	JP, 6-262071, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 20 September, 1994 (20. 09. 94) (Family: none)	1-7, 12-14
X	JP, 7-5161, A (Chuichi Hirayama), 10 January, 1995 (10. 01. 95) (Family: none)	1-5, 12, 13
X	Analytical Chemistry, <u>69</u> (1997), p.823-830	1-7, 12-14
X	Analytical Chemistry, <u>68</u> (1996), p.100-105	1-7, 12-14
A	Journal of Chromatography A, <u>776</u> (1997), p.75-80	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
4 June, 1999 (04. 06. 99)

Date of mailing of the international search report
15 June, 1999 (15. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02698

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ G01N30/48Int. Cl.⁸ G01N30/54

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ G01N30/48Int. Cl.⁸ G01N30/54

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1999年

日本国公開実用新案公報 1971-1999年

日本国登録実用新案公報 1994-1999年

日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-318551, A (新技術事業団), 8. 12月. 1995 (08. 12. 95), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 8-103653, A (テルモ株式会社), 23. 4月. 1996 (23. 04. 96), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 9- 49830, A (テルモ株式会社), 18. 2月. 1997 (18. 02. 97), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 6-262071, A (三菱化成株式会社), 20. 9月. 1994 (20. 09. 94), (ファミリー無し)	1-7, 12-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 06. 99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7- 5161, A(平山忠一), 10. 1月. 1995(10. 01. 95), (ファミリー無し)	1-5, 12, 13
X	Analytical Chemistry, <u>69</u> (1997), p. 823-830	1-7, 12-14
X	Analytical Chemistry, <u>68</u> (1996), p. 100-105	1-7, 12-14
A	Journal of Chromatography A, <u>776</u> (1997), p. 75-80	1-14